黄地老虎核型多角体病毒的一些特性

翁启勇　蔡秀玉　邓塔
(中国科学院动物研究所，北京　100080)

摘要　黄地老虎核型多角体病毒(*Agrotis segetum* Nulear Polyhedrosis Virus简称 AsNPV)的国内分离株 ($AsNPV^C$)，多角体呈六边形，大小 1.7—2.6μm，为多粒包埋类型。每个病毒束内有 2—7 个核衣壳，大小约 52nm × 308nm。感染烟青虫 (*Heliothis assulta*) 后分离到的多角体 (As-HaNPV) 其形状不规则，大小 0.7—2.6μm，亦为多粒包埋类型。核衣壳 2—6 个不等，大小约 40nm × 300nm。EcoRI 和 HindIII 限制性内切酶电泳图谱分析表明，$AsNPV^C$ DNA 和 As-HaNPV DNA 的 EcoRI、HindIII 酶切图谱一致，两者与 HaNPV DNA 的 EcoRI，HindIII 酶切图谱存在明显差异，$AsNPV^C$ DNA 的 EcoRI 酶切图谱共有 15 个片段，分子量在 12.74×10^6—1.18×10^6 道尔顿之间，总分子量约 88.6×10^6 道尔顿，相当于 134.25kbp。HaNPV DNA 的 EcoRI酶切图谱共有 19 个片段，分子量在 13.89×10^6—1.10×10^6 道尔顿之间，总分子量约 93.86×10^6 道尔顿，相当于 142.25kbp。AsNPV 对黄地老虎 2 龄和 4 龄幼虫以及对烟青虫 4 龄幼虫的 LD_{50} 分别为：1.4×10^5PIB、7.4×10^6PIB 和 2.61×10^4PIB。

关键词　黄地老虎　核型多角体病毒　限制性内切酶分析　毒力

1936 年 Paillot 首次报道了 AsNPV 感染黄地老虎 (*Agrotis segetum*) 幼虫后的病征及组织病理学变化，并简述了该多角体的形态大小 (Steinhaus, 1949)。此后，Shvetzova 等(1962)、Lipa 等(1971)、Burgerjon 等(1975)、Sherlock (1979、1983)、Allaway 等(1983、1984) 对 AsNPV 均做了报道。其中尤以 Lipa 和 Allaway 等人在 AsNPV 的形态结构、生物学特性及理化性质等方面研究较多。1985 年我们首次在国内分离到 AsNPV，并对其形态结构、核酸的部分特性及 $AsNPV^C$ 与 HaNPV 相互侵染宿主后的毒力作了研究，现报道结果如下。

材料与方法

1. 黄地老虎虫种采自新疆、徐州。烟青虫 (*Heliothis assulta*) 虫种，采自北京市郊。均为室内半人工饲料饲养传代的健康幼虫。饲养温度 25±1℃。

2. 病毒材料：$AsNPV^C$ 感染黄地老虎和烟青虫幼虫，HaNPV 感染烟青虫幼虫，增殖获死虫，经分离纯化得 $AsNPV^C$、As-HaNPV、HaNPV。

3. 药品：限制性内切酶为华美生物工程公司和中国医学科学院基础医学研究所产品，琼脂糖为 Serva 公司和中国科学院生物物理研究所产品，其它生化实验所用试剂均为分析纯。

4. 多角体及病毒形态观察：

(1) 取经过提纯的多角体制成适当的悬液，滴于小玻片上，自然干燥，喷金，于扫描电

本文于 1989 年 8 月收到。
有关烟青虫 NPV 的工作得到科学院重大项目部分经费资助。

镜（JSM-35CF）下观察。

(2) 取经过提纯的多角体制成适当的悬液，滴于带膜网片上，自然干燥后碱解（0.1 mol/L Na_2CO_3，0.17mol/L，NaCl）适当时间，经 2% 磷钨酸负染，在透射电镜（JEM-100C）下观察。

(3) 取经纯化多角体用 2.5% 戊二醛与 1% 锇酸、双固定，酒精脱水，Epon 812 包埋，醋酸铀与三铅双染。超薄切片按常规方法制作。于 JEM-100C 透射电镜下观察。

5. 病毒 DNA 的分离、纯化及限制性内切酶分析： 取纯化的病毒多角体，用碱解液配成 5mg/ml 的悬液，37℃ 水浴碱解 1 小时，5000rpm 离心 10 分钟，上清液加 20% SDS 至终浓度为 1%，60℃ 水浴保温 20 分钟，5000rpm 离心 10 分钟，上清液用 1mol/L HCl 将 pH 调至 7.8 左右，加入 PronaseE 及 50 倍的限制性内切酶缓冲液，使酶的终浓度为 25 μg/ml，37℃ 水浴保温 3 小时。加入等体积 1 × SSC 饱和的重蒸酚（pH8.0），室温下温和转动 10 分钟，5000rpm 离心分层，取上层水相用饱和酚重复抽提 2 次，水相加等体积乙醚除酚。在水相中加入 2 倍体积 95% 冷乙醇。－20℃ 过夜，8000rpm 离心沉淀 DNA，用 70%、80%、95% 乙醇漂洗沉淀的 DNA，真空干燥 DNA，加入 SSC 溶解。测 A_{260} 处的 OD 值，定浴液中 DNA 的浓度，－20℃ 贮存备用。

在含有 DNA 的酶反应液中(参照 Maniatis 等，1982)，加入 6—10U 酶。总反应体积 20μl，37℃ 保温 2 小时，加入 10 倍含 30% Ficoll、0.1% 溴酚兰、0.5mol/L EDTA、pH 7.5 的样品溶液，使终浓度为 1 倍，60℃ 水浴 10 分钟，室温冷却后进行电泳。琼脂糖凝胶电泳的胶浓度为 1%，胶长 140mm，胶厚 4mm 平板电泳，电泳时间 12—24，电压 35V。采用 TBE 电极缓冲液，溴化乙锭在合胶时直接加入胶中，终浓度为 0.5μg/ml。紫外分析仪下观察电泳结果。

6. 毒力测定： 将提纯的多角体配成悬液，在相差显微镜下计数，按实验需要配成不同浓度备用。用 50μl 不同浓度的多角体悬液滴加于 5mm³ 的昆虫半人工饲料块上，对照组加等量的蒸馏水。实验组与对照组幼虫均饥饿 6 小时。幼虫吃完带病毒饲料后加不带病毒的新鲜饲料。每组实验虫数 50 只或 40 只，分装于 26 × 80mm 指形管中，每管 1 只幼虫，重复三次。以上实验，包括对照组，均连续观察记录至第 9 天，死虫均经镜检，以确认是否为病毒致死。用 CASIO PB-110 计算机计算实验结果。

结 果 和 讨 论

一、多角体和病毒的形态特征：

1. AsNPV^C：多角体大多呈六边形，大小一般为 1.7—2.6μm（图版 I:1），为多粒包埋类型，每个病毒束内有 2—7 个核衣壳，以 3—4 个最多见(图版 I:3)。核衣壳为杆状，有的稍有弯曲，大小约为 308nm × 52nm（图版 I:2)。

2. AsNPV^C 感染烟青虫后分离到的多角体形状不规则，边缘较整齐，表面可见到尖状突起和多角体嵌合形状。多角体的大小差异较大，约为 0.7—2.6μm（图版 I:4)。为多粒包埋类型，每个病毒束内有核衣壳 2—6 个不等。核衣壳为杆状，大小约为 300nm × 40 nm（图版 I:5、6)。

AsNPV 的国内分离株（AsNPV^C）与 Lipa 等的波兰分离株（AsNPV^P）和 Sher

lock 的英国分离株（AsNPV^E）（Allaway 等，1983）在形态和大小上均较接近，至今已分离到的 AsNPV^P、AsNPV^F（法国分离株）、AsNPV^E 和 AsNPV^C 均为多粒包埋类型。国内已分离到的 HaNPV 属单粒包埋类型(蔡秀玉和丁翠，1982)，而 AsNPV^C 感染烟青虫后分离到的多角体病毒则为多粒包埋类型。从形态上可以认为 AsNPV^C 感染烟青虫幼虫后分离到的多角体不是 HaNPV。

二、DNA 的限制性内切酶分析：

AsNPV^C、HaNPV 及 As-HaNPV 的 DNA 经 EcoRI 及 HindIII 限制性内切酶剪切后的电泳图谱见图 1。以 λ-DNA 经 HindIII 酶切的片段做为标准 DNA 片段(图 1G)。AsNPV^C DNA 与 As-HaNPV DNA 经 HindIII 限制性内切酶作用的结果见图 1B、C，完全没有剪切的位点。HaNPV 经 HindIII 酶切，则明显有酶切的片段（图 1A)。AsNPV^C 与 As-HaNPV DNA 经 EcoRI 酶切电泳的片段数量和位点一样（图 1E、F)，

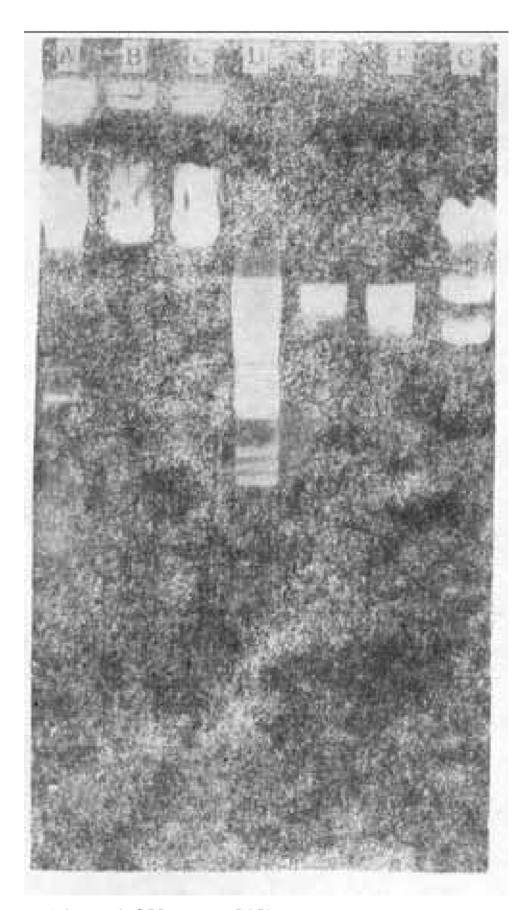


图 1　AsNPV、HaNPV 和 As-HaNPV DNA 的限制性内切酶电泳图

A. HaNPV DNA-HindIII B. AsNPV DNA-HindIII C. As-HaNPV DNA-HindIII D. HaNPV DNA-EcoRI E. As-HaNPV DNA-EcoRI F. AsNPV DNA-EcoRI G. DNA-HindIII

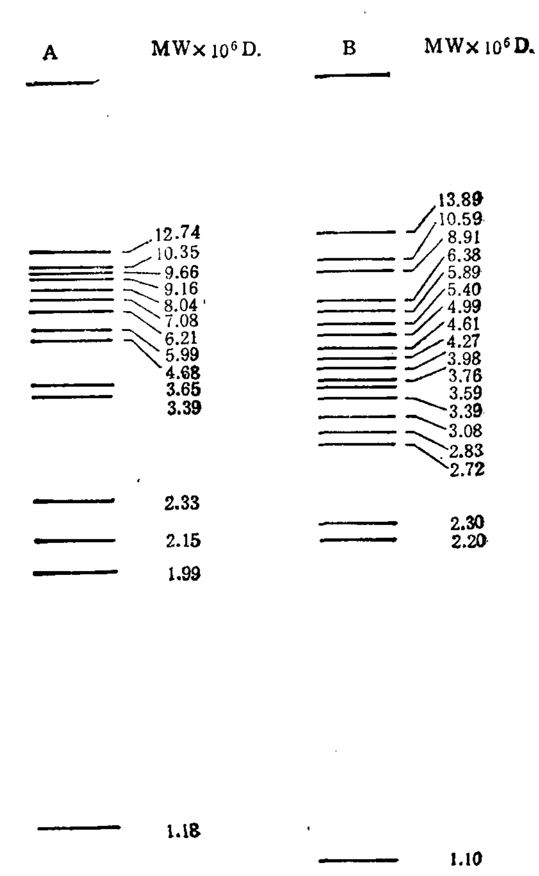


图 2　限制性内切酶图谱

A. AsNPV DNA-EcoRI B. HaNPV DNA-EcoRI

两者与 HaNPV DNA 的 EcoRI 酶切片段(图 1D)的数量和位点有明显差异。AsNPV^{C} DNA 及 As-Ha NPV DNA 经 EcoRI 酶切结果共有 15 条片段，最大片为 12.74×10^{6} 道尔顿，最小片段为 1.18×10^{6} 道尔顿，总分子量约 88.6×10^{6} 道尔顿，相当于 134.25kbp (图 2A)。HaNPV DNA 的 EcoRI 酶切结果共有 19 条片段，最大片段为 13.89×10^{6} 道尔顿，最小片段为 1.10×10^{6} 道尔顿，总分子量约为 93.86×10^{6} 道尔顿，相当于 142 25 kbp(图 2B)。

上述实验所采用的酶、酶切条件、电泳条件等均尽量与 Allaway 等 (1983) 对 AsNPV^{E}、AsNPV^{F}、AsNPV^{P} DNA 所采用的条件一致。Allaway 等(1983)报道，AsNPV^{E} DNA 与 AsNPV^{F} DNA 在 HindIII 作用下有 20 条片段，在 EcoRI 作用下有 32 条片段，总分子量约 93.45×10^{6} 道尔顿；AsNPV^{P} DNA 在 HindIII 作用下有 22 条片段，在 EcoRI 作用下有 14 条片段，总分子量约 87.79×10^{6} 道尔顿。上述结果说明，AsNPV 的国内分离株与欧洲的几个分离株的同源性存有差异。

三、毒力测定:

AsNPV^{C} 感染黄地老虎 2 龄、4 龄幼虫及烟青虫 4 龄幼虫，病毒浓度愈大，幼虫的死亡率愈高(表 1)。AsNPV^{C} 各浓度病毒在烟青虫 4 龄幼虫上造成的死亡率比实验中黄地老虎的两个龄期幼虫均高。同一浓度病毒感染下，不同虫种，虫龄的 LT_{50} 的差异是大的(表 2)。实验中烟青虫幼虫的 LT_{50} 值比同龄期的黄地老虎幼虫的小。上述结果说明烟青虫对 AsNPV^{C} 比黄地老虎原始宿主更敏感。实验中，黄地老虎 2 龄幼虫对任何浓度的 HaNPV 均不感染。据 Allaway 等(1984)，AsNPV^{E} 对黄地老虎及警纹鸣夜蛾(*Agrotis exclamationis*) 初孵幼虫的 LD_{50} 分别为 10PIB 和 420PIB。AsNPV^{P} 对黄地老虎初孵幼虫的 LD_{50} 为 350PIB (Allaway 等，1983)。而 AsNPV^{C} 对黄地老虎 2 龄、4 龄及烟青虫 4 龄幼虫的 LD_{50} 分别为 140000PIB、7400000PIB 及 26100PIB。因此，AsNPV^{C} 比 AsNPV^{E} 及 AsNPV^{P} 的毒力小。

表 1 病毒浓度与死亡率的关系

病毒浓度 (PIB/ml)	死亡率 (%)		
	黄地老虎幼虫		烟青虫幼虫
	2 龄	4 龄	4 龄
1.4×10^{4}	4.00	0	30.00
1.4×10^{5}	16.00	2.00	63.00
1.4×10^{6}	36.00	14.00	56.30
1.4×10^{7}	78.00	24.00	86.70
1.4×10^{8}	88.00	50.00	90.00

注：幼虫喂病毒后连续观察到第九天

综上所述，AsNPV 国内分离株与 AsNPV 的三株欧洲分离株，均属杆状病毒科 A 亚组黄地老虎核型多角体病毒。除了 AsNPV^{E} 和 AsNPV^{F} 限制性内切酶图谱一样外，其它几个分离株相互之间的限制性内切酶图谱均有差异，即它们的核酸序列不一样，而且

表 2　1.4×10^{8}PIB/ml 浓度下的半致死时间（LT_{50}）及其它

虫种虫龄	$LogLT_{50}$	Sm	Am	LT_{50}	上限	下限	LT_{95}
As 2 龄	0.7422	0.013	1.7%	5.5	5.9	5.2	9.8
As 4 龄	0.9504	0.028	2.9%	8.9	10.7	7.4	24.2
Ha 4 龄	0.7898	0.015	1.9%	6.2	6.7	5.7	9.5
Ha 5 龄	0.7764	0.015	1.9%	6.0	6.5	5.5	9.8

注：Am：有效中量准确度
　　Sm：有效中量的标准误差
　　上、下限是指 95% 置信限的上、下限

相互间的毒力大小差异也较大，但它们的病毒名称都一样，因此用宿主来命名病毒，不能反映病毒间真正的、本质的关系。吕鸿声(1982)曾综述过核型多角体大小在人工接种做病毒交叉感染试验中出现的两种情况，一种是病毒对新宿主的感染力较强，在新宿主体内形成的多角体形状不变；另一种是如果病毒对新宿主的感染很弱，则在新宿主体内形成的多角体形状往往不规则，表现不出或只能部分表现原来的固有形态。本文用 $AsNPV^{C}$ 感染烟青虫幼虫后，分离到的多角体形态不规则，大小也有一定变化，但其毒力却比在原宿主中高得多，与上述二种情况均不同。DNA 限制性酶切图谱及病毒形态研究表明，As-HaNPV 即为 $AsNPV^{C}$。

参　考　文　献

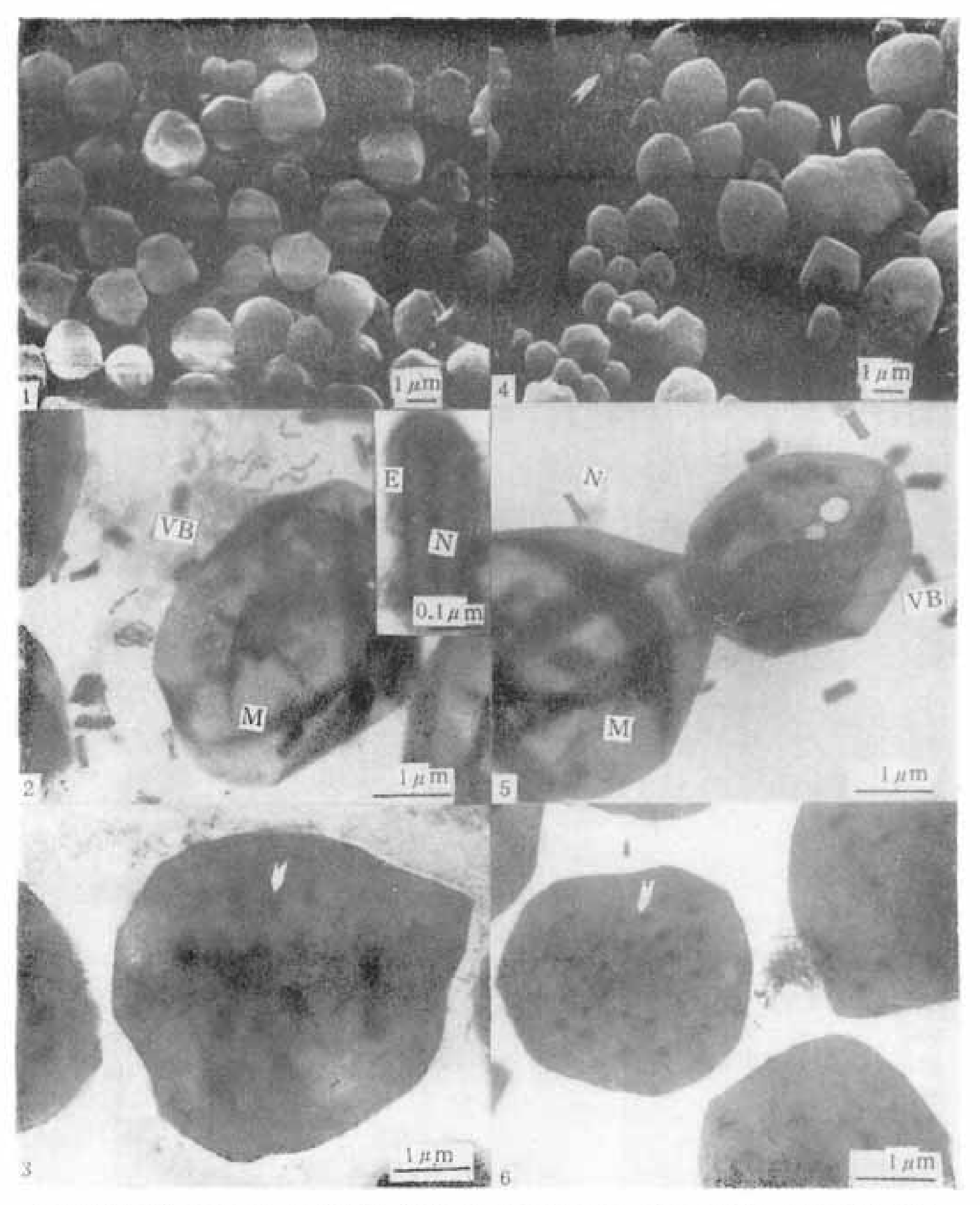
吕鸿声　1982　昆虫病毒与昆虫病毒病。第 63 页科学出版社。
蔡秀玉、丁翠　1982　在我国发现的一些昆虫病毒。昆虫学报 25(4)：413—5。
Allaway, G. P. *et al* 1983 A biochemical and biological comparison of three European isolates of nuclear polyhedrosis virus from *Agrotis segetum*. *Arch. Viro.* **75**: 43—54.
Allaway, G. P. et al 1984 Host range and virulence of five baculoviruses from lepidopterous hosts. *Ann. Appl. Biol.* **105**(1): 29—37.
Burgerjon, A. et al 1975 Recherches sur la spécificité de trois virus à polyèdres nucléaires vis-à-vis de *Mamestra brassicae, Scotia segetum, Trichoplusia ni* et *Spodoptera exigua*. *Entomophaga*. **20**: 153—60.
Lipa, J. J. et al 1971 Electron microscopy of nuclear polyhedrosis virus from *Agrotis segetum* Schiff. and *A. exclamationis* L. (L. N.). *Acta Microbiol. Pol. Ser. B.* **3**: 55—61.
Maniatis, T. et al 1982 "Molecular Cloning" by Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
Sherlock, P. L. 1979 A method for mass-rearing the cutworm *Agrotis segetum* in the laboratory. *Entomol. Exp. Appl.* **26**: 245—51.
Sherlock, P. L. 1983 The natural incidence of disease in the cutworm *Agrotis segetum* in England and Wales. *Ann. Appl. Biol.* **102**(1): 49—56.
Shvetzova, O. I. et al 1962 Virusnoe zabolevanije ozimoj i zernovoj sovok (Lepidoptera, Noctuidae) v uslovijach odnovremennovo zarazenija. *Entomologiceskoe obozrenije*. **41**: 781.
Steinhaus, E. A. 1949 Principles of insect pathology. McGraw-hill Book Company New York.

SOME PROPERTIES OF *AGROTIS SEGETUM* NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS

WENG QI-YONG CAI XIU-YU DENG TA
(*Institute of Zoology, Academia Sinica, Beijing* 100080)

Agrotis segetum nuclear polyhedrosis virus (AsNPV) isolated from the yellow cutworm larvae in Beijing is multiple-enveloped. The morpha and size of the polyhededral bodies and virus particles from *A. segetum* and *Heliothis assulta* infected with AsNPV (As-HaNPV) were observed with electron microscope. The electrophoretic profiles of DNA restriction endoclease fragments appeared to be identical in AsNPV and As-HaNPV, but they were different from that of HaNPV. The molecular weight of AsNPV-DNA EcoRI-digested fragments added up to be about 88.6×10^6 dalton (134.25 kbp). The comparative virulence of the virus in original host and alternative host was examined by measuring their median lethal concentrations (LC_{50}) and median lethal time (LT_{50}) in different instar larvae. The biochemical specificity and infectivity to *A. segetum* and alternative hosts of Chinese isolate of NPV from *A. segetum* have been compared with those of three European isolates (Allaway, et al. 1983)

Key words: *Agrotis segetum*——nuclear polyhedrosis virus——*restriction* endonuclease analysis——virulence



1.黄地老虎 NPV 的多角体。2.黄地老虎 NPV 的病毒束和核衣壳。多角体膜（M）病毒束（VB）核衣壳（N）囊膜（E）3.黄地老虎 NPV 的核衣壳。4.As NPV^{G} 感染烟青虫后分离的多角体（箭头示多角体嵌合和突起。5.AsNPV^{G} 感染烟青虫后分离的多角体。6.AsNPV^{G} 感染烟青虫后分离的多角体病毒粒子(箭头示病毒粒子)。